

Географическая изоляция и риботипы на примере некоторых эндемиков рода *Corydalis* (Fumariaceae)

Geographic isolation and ribotypes on the example of some endemics of the genus *Corydalis* (Fumariaceae)

Сухов А. С.¹, Михайлова М. А.², Мачс Э. М.²

Sukhov A. S.¹, Mikhailova M. A.², Machs E. M.²

¹ Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), г. Санкт-Петербург, Россия. E-mail: retu007@mail.ru

¹ Saint Petersburg State Institute of Technology (Technical University), Saint Petersburg, Russia

² Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН, г. Санкт-Петербург, Россия. E-mail: mmikhailova@binran.ru

² Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Science, Saint Petersburg, Russia

Реферат. Основной темой данной научной работы является изучение особенностей риботипов видов в условиях длительной географической и репродуктивной изоляции. Были выбраны три группы эндемиков. Первая группа – гипсофильные виды: *Corydalis sangardanica* Mikhailova, *C. microphylla* Mikhailova, *C. gypsophylla* Mikhailova. Вторая группа – наскальные подушковидные виды: *C. mira* (Batalin) C. Y. Wu et H. Chuang и *C. yazgulemica* Mikhailova et Sochivko. Третья группа – скальные, географически обособленные виды: *C. macrocalyx* Litv и *C. rupestris* Kotschy. Научной новизной в данной работе является применение генетических методов анализа в сфере изучения возможной гибридизации видов рода *Corydalis* (Fumariaceae). Секвенирование NGS было выполнено на платформе Illumina MiSeq. В качестве маркерного участка был взят первый транскрибируемый спейсер (ITS1) ядерного рибосомного гена 35S рДНК. В результате для каждого образца был получен набор многокопийных риботипов Zotu (zero-radius operational taxonomic unit), на основе которого было выполнено качественное и количественное сравнение образцов. Показано, что во всех трех группах отсутствуют общие риботипы. Число риботипов у изученных видов варьируется от одного до шести, что может быть связано с особенностями гибридизации в прошлом.

Ключевые слова. Внутренние транскрибируемые спейсеры, географическая изоляция, репродуктивная изоляция, риботипы, род *Corydalis*, секвенирование NGS.

Summary. The main topic of this scientific work is the study of the characteristics of species ribotypes under conditions of long-term ecological and reproductive isolation. Three groups of endemics were selected. The first group is gypsophilic species: *Corydalis sangardanica* Mikhailova, *C. microphylla* Mikhailova, *C. gypsophylla* Mikhailova. The second group is the rock cushion species: *C. mira* (Batalin) C. Y. Wu et H. Chuang, and *C. yazgulemica* Mikhailova et Sochivko. The third group is rocky, geographically isolated species: *C. macrocalyx* Litv, and *C. rupestris* Kotschy. The scientific novelty in this work is the use of genetic methods of analysis in the field of studying the possible hybridization of species of the genus *Corydalis* (Fumariaceae). NGS (Next-Generation Sequencing) was performed on the Illumina MiSeq platform. The first transcribed spacer (ITS1) of the nuclear ribosomal 35S rDNA gene was taken as a marker region. As a result, for each sample, a set of Zotu multicopy ribotypes (zero-radius operational taxonomic unit) was obtained, on the basis of which a qualitative and quantitative comparison of the samples was performed. It was shown that there are no common ribotypes in all three groups. The number of ribotypes in the studied species varies from one to six, which may be due to the peculiarities of hybridization in the past.

Key words. Genus *Corydalis*, geographic isolation, internal transcribed spacers, NGS, reproductive isolation, ribotypes.

Введение. Использование методов NGS позволяет по-новому взглянуть на обособленность видов и их родство. Задачей данной работы стало изучение особенностей риботипов видов рода *Corydalis* (Fumariaceae) в условиях длительной географической и репродуктивной изоляции.

Материалы и методы. Были выбраны три группы эндемиков. Первая группа – гипсофильные виды: *C. sangardanica* Mikhailova, *C. microphylla* Mikhailova, *C. gypsophylla* Mikhailova. Вторая группа – наскальные подушковидные виды: *C. mira* (Batalin) C. Y. Wu et H. Chuang и *C. yazgulemica* Mikhailova et Sochivko. Третья группа – скальные, географически обособленные виды: *C. macrocalyx* Litv и *C. rupestris* Kotschy. Секвени-

рование NGS было выполнено на платформе Illumina MiSeq. В качестве маркерного участка был взят первый транскрибируемый спейсер (ITS1) ядерного рибосомного гена 35S рДНК. Были использованы праймеры ITS-1p (Ridgway et al., 2003) и ITS-2 (White et al., 1990). Подготовка библиотек проводилась на амплификаторе BioRad T-100 с использованием набора Plant PCR Master Mix Thermo Scientific по следующему протоколу: начальная денатурация 98 °С 5 мин.; 30 циклов амплификации (98 °С 5 с., 56 °С 5 с., 72 °С 15 с.); финальный синтез 72 °С 1 мин.; хранение 12 °С. Обработка данных проводилась с использованием программ FastQC (Babraham Bioinformatics) и Usearch (Edgar, 2010). Окончательная фильтрация низко гомологичных риботипов проводилась по выравниваниям с использованием программы Mega (Edgar, 2010; Kumar et al., 2018) и сервиса BLAST NCBI. В результате для каждого образца был получен набор многокопийных риботипов Zotu (zero-radius operational taxonomic unit), на основе которого было выполнено качественное (наличие общих, т. е. одинаковых риботипов) и количественное (относительное число риботипов и особенности нуклеотидных замен) сравнение образцов.

Результаты. Показано, что во всех видах отсутствуют общие риботипы. Число риботипов у изученных видов варьирует от одного до шести, без учета минорных. В случае наличия нескольких риботипов, один из риботипов преобладает (до 80 %), хотя, чем больше риботипов, тем менее выражено преобладание. Для групп видов характерны общие нуклеотидные замены. Всего имеется 24 парсимонично-информативных замен (рис. 1). Сайты 107 и 219 являются полиморфными для всех групп. В целом, вторая и третья группы обладают достаточно сходными риботипами и имеют большое количество одинаковых замен. В трёх положениях имеются нуклеотидные замены, отличающие первую и вторую группы от третьей.

Виды	Риботипы	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 2																								
		8 9 9 9 0 0	0 0 1 1 1 3 3 3 4 4 5 6 6 7 7 8 1 1 5	8 7 8 9 6 7	8 3 5 6 5 6 8 7 8 0 3 5 8 9 0 8 9 9																					
<i>C. mira</i>	Zotu106	T	T	C	A	C	G	A	G	G	A	-	-	C	A	G	C	T	G	A	A	A	C	T	G	2 группа наскальные подушковидные виды
	Zotu115	T	
	Zotu157	G	.	.	
	Zotu20	T	
	Zotu39	G	.	
	Zotu87	T	
<i>C. yuzgulemica</i>	Zotu42	A	T	
<i>C. sangardanica</i>	Zotu156	.	C	.	G	.	C	C	S	T	G	A	.	G	.	G	.	G	A	A	T	1 группа гипсофильные виды
	Zotu183	.	.	.	G	.	C	T	C	T	G	A	.	G	.	G	.	G	.	A	.	
	Zotu192	.	C	A	G	.	C	C	S	T	G	A	.	G	T	G	.	G	.	A	.	
	Zotu49	.	C	A	G	.	C	C	S	T	G	A	.	G	T	G	.	G	.	A	T	
	Zotu51	.	.	.	G	.	C	T	C	T	G	A	.	G	.	G	.	G	.	A	T	
<i>C. gypsophylla</i>	Zotu132	C	C	.	T	G	C	C	.	.	.	C	S	T	G	A	.	G	.	G	.	G	.	A	T	3 группа скальные географически обособленные виды
	Zotu188	C	C	.	G	G	C	C	.	.	.	C	S	T	G	A	.	G	.	G	.	G	.	A	.	
	Zotu60	C	C	.	G	G	C	C	.	.	.	C	S	T	G	A	.	G	.	G	.	G	.	A	T	
<i>C. microphylla</i>	Zotu120	.	C	.	G	.	C	C	T	T	G	A	.	G	.	G	.	G	.	A	T	
	Zotu134	C	C	.	-	G	C	C	.	.	.	C	S	T	G	A	.	G	.	G	.	G	.	A	T	
	Zotu194	.	C	.	G	.	C	C	S	T	G	A	T	G	.	G	.	G	A	A	T	
	Zotu213	.	C	.	G	.	C	C	T	T	G	A	.	G	.	G	.	G	.	A	T	
<i>C. macrocalyx</i>	Zotu11	A	.	T	C	C	T	3 группа скальные географически обособленные виды
	Zotu149	A	.	T	C	C	T	
	Zotu71	A	.	T	C	C	T	
<i>C. rupestris</i>	Zotu166	A	.	T	C	G	C	T	
	Zotu176	A	.	T	C	G	T	C	T	
	Zotu189	A	.	T	C	G	C	T	
	Zotu30	A	.	T	C	G	C	T	

Рис. 1. Парсимонично-информативные нуклеотидные замены в риботипах изученных видов.

Сравнение риботипов внутри гипсофильной группы выявило наличие у вида *C. sangardanica* одного сравнительно малокопийного риботипа, имеющего одну уникальную замену, а также одну замену, общую с риботипом Zotu194 вида *C. microphylla*, это может свидетельствовать о наличии у данных видов общего предка. Кроме того, имеется протяженная четырехнуклеотидная замена у многокопийного (38,76 % от общего числа риботипов вида) Zotu120 вида *C. microphylla*. Сравнение риботипов *C. mira* и

C. yazgulemica выявило 7 нуклеотидных замен, 3 из которых характерны для вида *C. yazgulemica*. Сравнение риботипов *C. macrocalyx* и *C. rupestris* выявило 6 нуклеотидных замен, 3 из которых характерны для вида *C. rupestris* (рис. 2).

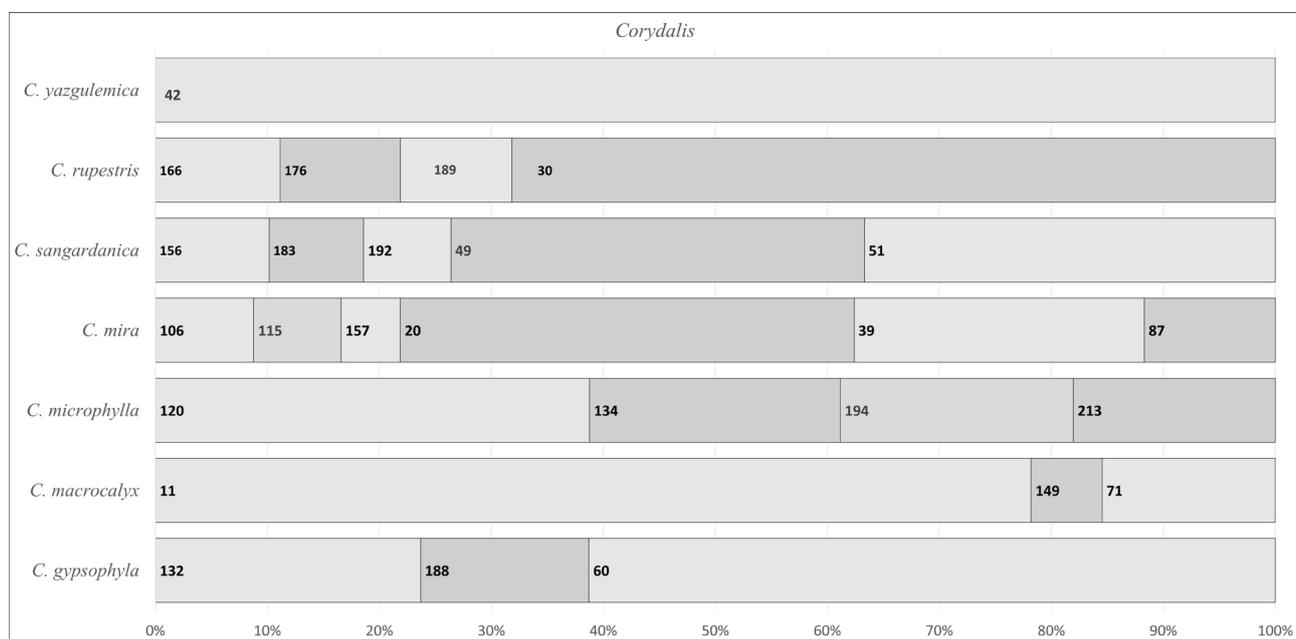


Рис. 2. Распределение риботипов в видах рода *Corydalis*.

Обсуждение. Мы предполагаем, что отсутствие общих риботипов у близких видов одного рода связано с длительной репродуктивной изоляцией, сформировавшейся в период горно-образовательного процесса Средней Азии (от 20–40 млн лет назад). Разное число риботипов у одного вида может быть связано с особенностями гибридизации в прошлом. То, что определенные нуклеотидные замены характерны для групп, может указывать на монофилетичность или на наличие общих предков. Мы полагаем, что между риботипами видов *C. mira*, *C. yazgulemica* и *C. macrocalyx*, *C. rupestris* есть большее сходство, чем между риботипами видов, встречающихся на гипсах: *C. sangardanica*, *C. microphylla*, *C. gypsophyla*. Возможно, это связано с типом экологической приуроченности. У вида *C. microphylla* в многокопийном риботипе Zotu120 отмечена протяженная четырехнуклеотидная замена, которая является маркером данного вида. Для вида *C. yazgulemica* (1 риботип) характерно малое число нуклеотидных замен. У исследованных видов связи между числом риботипов и числом нуклеотидных замен не обнаружено.

Таким образом, мы считаем, что метод сравнительной метогеномики позволяет сравнивать не только виды, но и группы видов, связанные с географической и экологической приуроченностью.

Благодарности. Работа выполнена в рамках реализации государственного задания согласно Плану НИР Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН по темам: регистрационный номер 122011800672-6 (А. Сухов, Э. Мачс — секвенирование и биоинформационная обработка, написание статьи); и “Сосудистые растения Евразии: систематика, флора, растительные ресурсы” (регистрационный номер АААА-А19-119031290052-1), (М. Михайлова — сбор материала, таксономическая обработка).

ЛИТЕРАТУРА

- Edgar R. C.** Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // *Bioinformatics*, 2010. – Vol. 26(19). – P. 2460–2461.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Nnyaz C., Tamura K.** MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // *Mol. Biol. Evol.*, 2018. – Vol. 35. P. 1547–1549.
- Ridgway K. P., Duck J. M., Young J. P. W.** Identification of roots from grass swards using PCR-RFLP and FFLP of the plastid trnL (UAA) intron // *BMC Ecol.*, 2003. – Vol. 3. – P. 8.
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* / M. A. Innis, Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. (eds.). – Academic Press, Inc.: New York, NY, USA, 1990. – P. 315–322.